

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：11501  
研究種目：若手研究  
研究期間：2018～2021  
課題番号：18K16046  
研究課題名(和文) 遺伝性色素異常症の遺伝子解析システムの確立およびゲノム編集技術を用いた機能解析  
研究課題名(英文) Establishment of an efficient gene testing system for hereditary pigmentation disorders and functional analysis using genome editing technology  
研究代表者  
岡村 賢 (Okamura, Ken)  
山形大学・医学部・助教  
研究者番号：40637229  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：眼皮膚白皮症やまだら症、遺伝性対側性色素異常症など、単一の遺伝子の変異によって引き起こされる遺伝性色素異常症が疑われる患者さんに対し、網羅的に責任遺伝子群の遺伝子変異を検査できるシステムを構築しました。これにより、診断精度・効率が飛躍的に向上し、従来の方法で診断不能であった患者さんの正確な診断に繋げることもできました。さらに、遺伝子変異の病原性がわからないものに関しては、ゲノム編集技術を用いてマウスを使って患者さんと同じ変異を再現することでその変異の機能的意義、さらにはその遺伝子の働きの一端を解明することができました。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性色素異常症は、皮膚の色素低下や増強以外に症候性(他臓器に合併症を持つ)の場合がある。例えば、症候性眼皮膚白皮症の一つであるHermansky-Pudlak症候群の1型、4型では30歳以降に致死的な間質性肺炎の合併がほぼ必至であり、若年期の臨床所見から病型を推測するのは困難である。残念ながら未だ確立した治療法はないものの、遺伝子診断により今後来しうる合併症の予測が可能となり、個々の病型に応じた適切な患者さんへの指導やフォローアップが可能となる。さらに、これら原因遺伝子の機能は未解明の部分が多く、その機能解明は、将来の根本的治療法に繋がる架け橋となりうる。

研究成果の概要(英文)：We successfully made up a new system which can screen gene mutations associated with hereditary pigmentation disorders such as oculocutaneous albinism, piebaldism, and dyschromatosis symmetrica hereditaria. This system is based on sequencing by next generation sequencer, thus, we can identify gene mutations rapidly, accurately, and exhaustively. In fact, we could detect rare mutations in patients of which we had failed in gene diagnosis by a previous technique.

Furthermore, we clarified the functional meaning of a new gene mutation as well as a part of function of the gene by using a genome-edited mouse model reflecting the genetic condition of the patient.

研究分野：色素異常症

キーワード：遺伝性色素異常症 眼皮膚白皮症 ゲノム編集 CRISPR/Cas9

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

当研究室では 2007 年より眼皮膚白皮症をはじめとした遺伝性色素異常症の遺伝子変異検索を行ってきた。これまでは PCR-SSCP 法で各遺伝子の変異スクリーニングを、頻度の高い責任遺伝子に絞って行い、サンガー法により異常を認めた領域をシーケンスすることで変異を同定していた。しかし、特に 10 年程前より次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer: NGS) による遺伝子解析が主流となり、遺伝性色素異常症においても次々と新たなサブタイプ・責任遺伝子が同定された。そのため、従来の遺伝子変異スクリーニング法は非効率かつ不完全なものとなり、新規遺伝子変異スクリーニング法の確立は急務であった。

### 2. 研究の目的

- (1) NGS を用いた効率的かつ正確な遺伝性色素異常症の遺伝子変異スクリーニング法を確立する。
- (2) 新規に同定された遺伝子変異、あるいは新規原因遺伝子の機能解析を行い、各遺伝性色素異常症の病態・発症メカニズムを解明する。

### 3. 研究の方法

(1) 山形大学内に設置済の NGS (Ion PGM, Thermo Fisher Scientific) を用いて遺伝性色素異常症に関わる既知の責任遺伝子群、および責任候補遺伝子群 (マウスの相同遺伝子では色素異常に関わることが知られているなど) にターゲットを絞って遺伝子変異を網羅的にスクリーニングする。具体的には、Ion AmpliSeq Designer (Thermo Fisher Scientific) を用いてターゲット遺伝子のコーディング領域・flanking 領域をカバーできる Custom Panel をデザインし、それを用いて DNA ライブラリを作成し、Ion PGM にてシーケンスを施行する。シーケンスの生データ (fastq または BAM 形式ファイル) は cloud 上の Ion Reporter (Thermo Fisher Scientific) 内のパイプラインを用いて解析することで変異の同定を行う。NGS データは特に挿入欠失変異の同定においてエラーが多いため、同定された病的変異は全てサンガー法にて確認することとした。

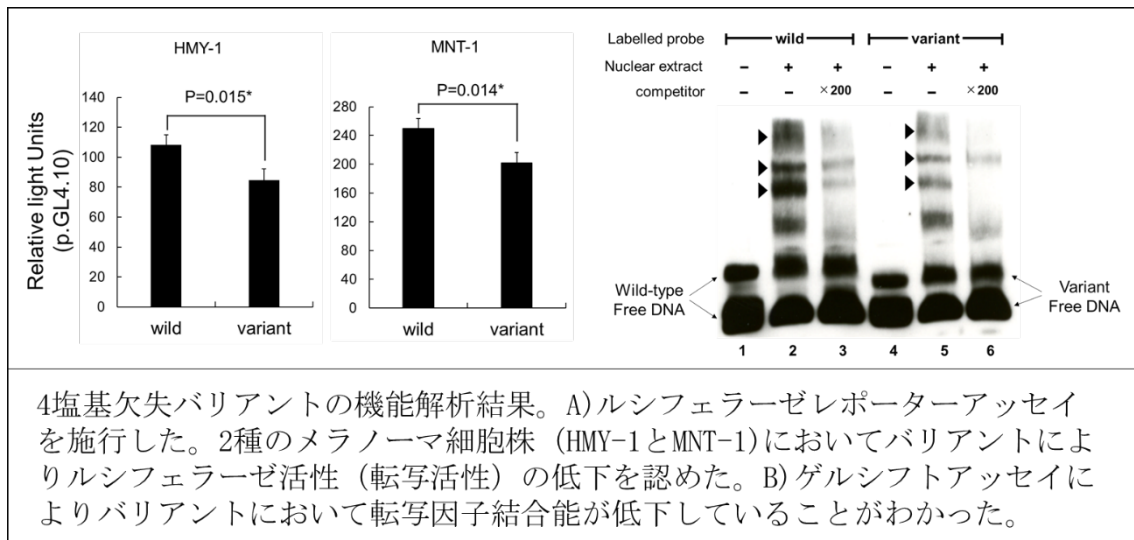
(2) 新規に同定された遺伝子変異もしくは新規原因遺伝子に関しては、主に CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集技術により、当該遺伝子のノックアウト・もしくは当該遺伝子変異のノックインを行うことで機能解析を行う。ゲノム編集に関しては、山形大学遺伝子実験センターの協力を得て、Integrated DNA Technologies (IDT) 社のプロトコールに沿って施行した。具体的には、PAM 配列を含む遺伝子切断ターゲット領域の RNA オリゴ (crRNA) とトランス活性化型 crRNA を混合することでガイド RNA を作成し、これと遺伝子切断酵素である Cas9 と複合体 (RNP complex) を形成させる。この RNP complex を受精卵もしくは培養細胞に導入することで *in vivo* もしくは *in vitro* でゲノム編集を行う。ゲノム編集に成功した後は、フェノタイプの解析やメラニンの組成解析、病理組織学的解析など多角的にその機能を解析していく。

### 4. 研究成果

(1) まず初年度に従来のスクリーニング法で診断不能であった症例 (未診断例) 55 例、および新規症例 35 例を上記方法にて解析した。その結果、未診断例 22 例 (40%)、新規症例 30 例 (85%) において遺伝的に診断が確定した。その中には、Hermansky-Pudlak 症候群 (HPS) 2, 3, 6 型、Tietz 症候群など、日本人では未報告、もしくは報告の非常に少ない症例が複数含まれていた。さらに、本遺伝子変異スクリーニング法でも遺伝的に診断不能であった症例の多くは、臨床的にも病的か健常範囲内であるかの中間的な症例であり、本診断法は非常に効率的かつ正確性の高いものであると結論づけ、その方法論および複数の稀な症例を学術誌に報告した<sup>1-5</sup>。研究期間全体を通して、約 120 家系の新規症例の遺伝子解析を行い、安定した解析結果を得ることができている。

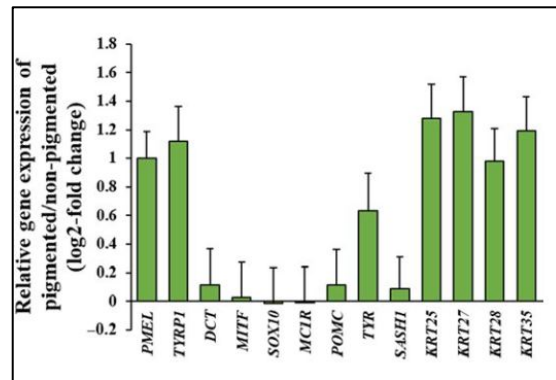
(2) OCA4 の原因遺伝子である *SLC45A2* のヘテロ接合性病変が一つのみ確認され、もう一方の変異が確認できない症例 (suspected OCA4: sOCA4) において、*SLC45A2* のプロモーター領域にある c. -492\_489delAATG の 4 塩基欠失多型が sOCA4 患者の大半に認められることを見出した。さらに *in vitro* の実験にて、この欠失バリエントにより遺伝子転写活性・DNA 結合能が低下することを示し (下図)、c. -492\_489delAATG はもう一方の病的変異と組み合わせることによ

り、OCA4 を発症すると結論づけ、学術誌に報告した<sup>6</sup>。また、このバリエントは健常人の数%においてキャリアーであることがわかり、日本人皮膚色にも影響を与えることを報告した<sup>7</sup>。

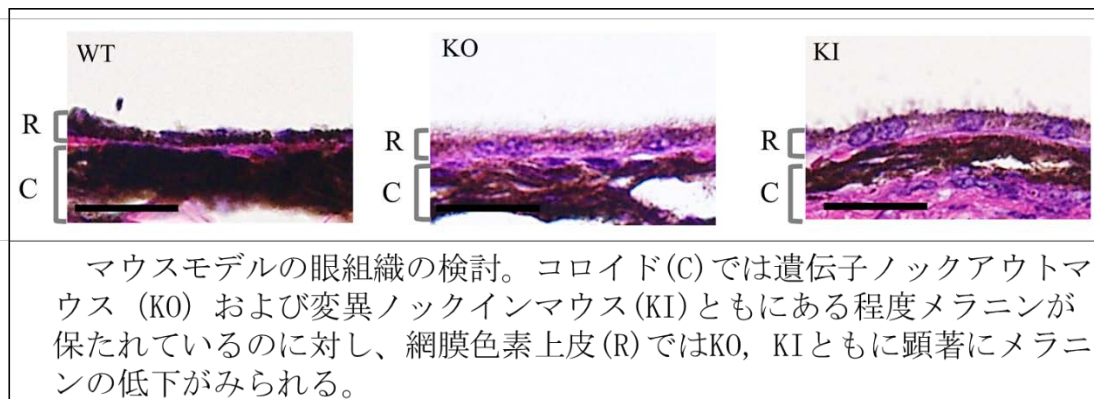


4塩基欠失バリエントの機能解析結果。A) ルシフェラーゼレポーターアッセイを施行した。2種のメラノーマ細胞株 (HMY-1とMNT-1)においてバリエントによりルシフェラーゼ活性 (転写活性) の低下を認めた。B) ゲルシフトアッセイによりバリエントにおいて転写因子結合能が低下していることがわかった。

(3) これまで本邦未報告の "Autosomal dominant lentiginous phenotype" (責任遺伝子: SASH1) と呼ばれる病態の患者を新規に 4 家系同定し、計 3 つの新規遺伝子変異を同定した。この疾患は、幼少時から顔面四肢などの露光部にそばかす様の細かい褐色斑が多発する常染色体顕性遺伝性疾患であるが、その疾患メカニズムは全く解明されていない。患者の皮膚組織 (色素増強部と健常部) 由来の RNA を用いて、トランスクリプトーム解析を行ったところ色素増強部においてメラニン産生に関わる遺伝子群と毛包上皮に特異的に発現するケラチン遺伝子群の発現上昇を認め (右図)、臨床症状・病理所見とともに学術誌に報告した<sup>8</sup>。



(4) 日本人第一例目となる眼皮膚白皮症 6 型 (OCA6) の症例に関しては、その患者の持つ新規ミスセンス変異に関して詳細な機能解析を行った。具体的には、CRISPR/Cas9 システムを用いて、患者と相似するミスセンス変異を持つモデルマウスを作成し、皮膚 (耳介) および毛髪のメラニン分析を行った。その結果、この変異を持つことでフレームシフト変異を導入したノックアウトマウスとはほぼ同様の色素低下を起し、特に毛髪においてフェオメラニン/ユーメラニン比が有意に上昇していることがわかった。すなわち、同変異が機能低下型の病的変異であることを証明することができた。さらに、OCA6 の原因遺伝子である *SLC24A5* の網膜色素上皮と神経堤由来の色素細胞 (メラノサイト) のメラニン産生への貢献度について検討し、網膜色素上皮においてより顕著にメラニン産生能が低下することを見出した (下図)。これは、OCA6 患者において皮膚や毛髪の色素低下が軽度にも関わらず、重症の眼症状を呈することの根拠となりうる<sup>9</sup>。



マウスモデルの眼組織の検討。コロイド (C) では遺伝子ノックアウトマウス (KO) および変異ノックインマウス (KI) とともにある程度メラニンが保たれているのに対し、網膜色素上皮 (R) では KO, KI とともに顕著にメラニンの低下がみられる。

- 1 Okamura K, Hayashi M, Abe Y *et al.* NGS-based targeted resequencing identified rare subtypes of albinism: Providing accurate molecular diagnosis for Japanese patients with albinism. *Pigment Cell Melanoma Res* 2019; **32**: 848-53.
- 2 Nishikawa T, Okamura K, Moriyama M *et al.* Novel AP3B1 compound heterozygous mutations in a Japanese patient with Hermansky-Pudlak syndrome type 2. *J. Dermatol.* 2020; **47**: 185-9.
- 3 Nagatani K, Okamura K, Katagiri K *et al.* Report of two Japanese patients with piebaldism including a novel mutation in KIT. *J. Dermatol.* 2021; **48**: e94-e5.
- 4 Matsuyuki K, Ide M, Houjou K *et al.* Novel AP3B1 mutations in a Hermansky-Pudlak syndrome type2 with neonatal interstitial lung disease. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2022; **33**: e13748.
- 5 Saito T, Okamura K, Funasaka Y *et al.* Identification of two novel mutations in a Japanese patient with Hermansky-Pudlak syndrome type 5. *J. Dermatol.* 2020; **47**: e392-e3.
- 6 Okamura K, Hayashi M, Nakajima O *et al.* A 4-bp deletion promoter variant (rs984225803) is associated with mild OCA4 among Japanese patients. *Pigment Cell Melanoma Res* 2019; **32**: 79-84.
- 7 Okamura K, Abe Y, Hayashi M *et al.* Impact of a 4-bp deletion variant (rs984225803) in the promoter region of SLC45A2 on color variation among a Japanese population. *J. Dermatol.* 2019; **46**: e295-e6.
- 8 Araki Y, Okamura K, Saito T *et al.* Five novel mutations in SASH1 contribute to lentiginous phenotypes in Japanese families. *Pigment Cell Melanoma Res* 2021; **34**: 174-8.
- 9 Saito T, Okamura K, Kosaki R *et al.* Impact of a SLC24A5 variant on the retinal pigment epithelium of a Japanese patient with oculocutaneous albinism type 6. *Pigment Cell Melanoma Res* 2022; **35**: 212-9.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsuyuki Keigo, Ide Mizuki, Houjou Keishirou, Shima Saho, Tanaka Seiji, Watanabe Yoriko, Tomino Hiroyuki, Egashira Tomoko, Takayanagi Toshimitsu, Tashiro Katsuya, Okamura Ken, Suzuki Tamio, Miyamoto Takayuki, Shibata Hirofumi, Yasumi Takahiro, Nishikomori Ryuta	4. 巻 33
2. 論文標題 Novel AP3B1 mutations in a Hermansky-Pudlak syndrome type2 with neonatal interstitial lung disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatric Allergy and Immunology	6. 最初と最後の頁 1~4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pai.13748	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saito Toru, Okamura Ken, Kosaki Rika, Wakamatsu Kazumasa, Ito Shosuke, Nakajima Osamu, Yamashita Hidetoshi, Hozumi Yutaka, Suzuki Tamio	4. 巻 35
2. 論文標題 Impact of a SLC24A5 variant on the retinal pigment epithelium of a Japanese patient with oculocutaneous albinism type 6	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pigment Cell & Melanoma Research	6. 最初と最後の頁 212~219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pcmr.13024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okamura Ken, Hayashi Masahiro, Abe Yuko, Kono Michihiro, Nakajima Kimiko, Aoyama Yumi, Nishigori Chikako, Ishimoto Hiroshi, Ishimatsu Yuji, Nakajima Mika, Hozumi Yutaka, Suzuki Tamio	4. 巻 32
2. 論文標題 NGS based targeted resequencing identified rare subtypes of albinism: Providing accurate molecular diagnosis for Japanese patients with albinism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pigment Cell & Melanoma Research	6. 最初と最後の頁 848~853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pcmr.12800	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okamura Ken, Hayashi Masahiro, Nakajima Osamu, Kono Michihiro, Abe Yuko, Hozumi Yutaka, Suzuki Tamio	4. 巻 32
2. 論文標題 A 4-bp deletion promoter variant (rs984225803) is associated with mild OCA4 among Japanese patients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pigment Cell & Melanoma Research	6. 最初と最後の頁 79~84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pcmr.12727	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okamura Ken, Fukushima Satoshi, Yamashita Junji, Abe Yuko, Hayashi Masahiro, Hozumi Yutaka, Ihn Hironobu, Suzuki Tamio	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Natural course of epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation in a Japanese family with the p.P25L mutation in KRT5	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14788	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okamura Ken, Abe Yuko, Hayashi Masahiro, Saito Toru, Nagatani Kei, Tanoue Toshihide, Wataya-Kaneda Mari, Hozumi Yutaka, Suzuki Tamio	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Impact of a 4-bp deletion variant (rs984225803) in the promoter region of SLC45A2 on color variation among a Japanese population	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14831	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Toru Saito
2. 発表標題 Impact of a SLC24A5 novel mutation identified in the first Japanese patient with oculocutaneous albinism 6 on retinal pigment epithelium
3. 学会等名 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡村 賢
2. 発表標題 遺伝性色素異常症の遺伝子解析システムの確立およびゲノム編集技術を用いた機能解析
3. 学会等名 日本皮膚科学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------